

## MAGE-3 原核表达载体的构建和表达

孙晓东<sup>1</sup> 吴金民<sup>2</sup> 刘杏娥<sup>2\*</sup>

(浙江大学医学院附属邵逸夫医院<sup>1</sup> 普外科<sup>2</sup>; 肿瘤中心 杭州 310016)

**摘 要** 通过 RT-PCR 扩增 957bp 的 MAGE-3 全长编码序列,将该片段克隆至 pGEX-4T-2 原核表达载体,转化大肠杆菌 BL-21,经 IPTG 诱导表达,并经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,考马斯亮蓝染色及 Western blot 鉴定,证明了目的基因的有效表达,目的蛋白高达细菌总蛋白的 32%。表达产物经 Glutathione Sepharose 4B 纯化后,每 100mL 菌液最终可获得 3mg 的目的蛋白,蛋白纯度在 90% 以上。纯化的 GST-MAGE-3 蛋白在体外冲击树突状细胞,能诱导特异性 CTL 杀伤肿瘤细胞活性。

**关键词** GST-MAGE-3 蛋白,原核表达,树突状细胞,细胞毒 T 淋巴细胞,免疫应答

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0277-04

黑色素瘤抗原(Melanoma antigen-encoding gene, MAGE)基因的表达产物是一种肿瘤排斥抗原。1991 年首先发现于黑色素瘤细胞系中,后来发现在人类多种恶性肿瘤中均可检测到 MAGE 基因的表达<sup>[1-3]</sup>。MAGE 基因是一个大家族,包括 12 个 MAGE-A、4 个 MAGE-B 和一个 MAGE-C 成员。它们属于肿瘤-睾丸抗原家族,只在肿瘤、睾丸、胎盘中表达,而在正常体细胞中不表达,因此在抗肿瘤免疫治疗中是理想的靶抗原,因为针对这些靶抗原的免疫应答不会对正常细胞造成伤害,而且使用范围广<sup>[4]</sup>。在 MAGE 基因家族中,MAGE-3 是恶性肿瘤中表达最高的成员之一,它含有 315 个氨基酸残基,已知分子内至少有 5 个 MHC-I 类分子限制的表位和 4 个 MHC-II 类分子限制的表位<sup>[5-8]</sup>。在以 MAGE-3 为基础的肿瘤疫苗研究方面,目前文献报道较多的是人工合成 MAGE-3 分子中已知的受 MHC-I 类分子限制的小肽,一般为九肽,体外冲击树突状细胞(Dendritic cell, DC),然后回输 DC 进行免疫治疗<sup>[9]</sup>,或将小肽制成肽疫苗直接免疫<sup>[10]</sup>。虽然体外实验令人鼓舞,并已开展了部分临床试验,取得了一定的疗效<sup>[11-13]</sup>,但 DC 疫苗和肽疫苗的 MHC 限制性制约了其应用。全蛋白疫苗与肽疫苗相比有不少优点。本实验利用 pGEX 原核表达系统在大肠杆菌中表达 GST-MAGE-3 融合蛋白,体外检测其诱导特异性免

疫应答的能力,为进一步研究 MAGE-3 全蛋白肿瘤疫苗提供基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细菌、质粒和细胞

大肠杆菌 JM109 和 BL-21 由本室保存。pGEM-T 载体购自 Promega 公司。pGEX-4T-2 原核表达载体购于 Pharmacia 公司。MKN-45 胃癌细胞株购自中科院上海细胞所细胞库,SGC-7901 胃癌细胞株购自浙江省肿瘤研究所。

#### 1.2 主要试剂及酶

TaqDNA 合成酶、逆转录酶、还原性谷胱甘肽购自上海生工生物工程公司。T4 DNA 连接酶、限制酶为 Promega 公司产品。Glutathione Sepharose 4B 购于 Pharmacia。人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(Human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, hGM-CSF)、人白细胞介素-4(Human interleukin-4, hIL-4)及人肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Human tumor necrosis factor- $\alpha$ , hTNF- $\alpha$ )购自晶美生物技术有限公司。抗 MAGE-3 一抗为 Santa Cruz 公司产品,生物素标记的二抗购自北京中山生物技术公司。

#### 1.3 pGEX-MAGE-3 原核表达载体在大肠杆菌 BL-21 中的表达

重组质粒 pGEX-MAGE-3 转化大肠杆菌 BL-21,

在 Amp<sup>r</sup> 琼脂平板上挑选单菌落接种入 10mL LB/amp 培养基, 37°C 培养过夜。次日以 1:100 比率接种 LB/amp, 继续 37°C 培养 2h, 加 IPTG 至终浓度 0.1mmol/L, 25°C 继续培养过夜。收集细菌, 超声裂解细菌, 离心后收集上清。

#### 1.4 GST-MAGE-3 融合蛋白的纯化

每 1mL 细菌裂解上清加 10 $\mu$ L Glutathione Sepharose 4B, 室温 30min 后 500g 离心 5min, 弃上清, 用 PBS 洗 3 次, 加 20 $\mu$ L 10mmol/L 还原型谷胱甘肽洗脱液室温放置 10min, 离心后收集上清。

#### 1.5 12% SDS-PAGE 电泳

常规制备 12% 分离胶和 5% 积层胶。分别将转化 pGEX-MAGE-3 载体组、转化空载体组和未转化组的裂解上清及上述纯化后的上清上样后电泳。考马斯亮蓝染色观察。

#### 1.6 Western blot 鉴定

表达产物按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭, 依次加入抗 MAGE-3 的一抗和生物素标记的二抗, 最后加 ECL 曝光显色。

#### 1.7 GST-MAGE-3 融合蛋白冲击树突状细胞体外诱导免疫应答试验

纯化的蛋白上清经 Lowry 法测蛋白浓度, 过滤除菌。人外周血单个核细胞经 GM-CSF 100ng/mL, IL-4 500ng/mL 培养 5~7d, 加 MAGE-3 20 $\mu$ g/mL, TNF- $\alpha$  100ng/mL 继续培养 24h, 收集悬浮细胞作为抗原呈递细胞 (Antigen presenting cells, APC), 经丝裂霉素 C (25 $\mu$ g/mL) 去增殖, 与同种 T 淋巴细胞共培养 7d, 分离 T 淋巴细胞作为效应细胞, 分别检测 T 细胞对 MAGE-3 阳性和 MAGE-3 阴性肿瘤细胞的杀伤活性 (MTT 法)。

## 2 结 果

### 2.1 pGEX-MAGE-3 原核表达载体的构建和鉴定

根据 MAGE-3 cDNA 序列, 按照引物设计原则设计引物, 带有 Sal I 限制酶位点的上游引物序列为 5'AGTCGACACCTCTTGAGCAGAGGACT 3', 下游引物带有 Not I 限制酶位点, 其序列为 5'TGCGCCGCCTCTCTCAAACCCACT 3'。通过 T-PCR 从胎盘组织中扩增 MAGE-3 目的基因, 片段长度 957bp, 将 PCR 产物纯化后与 pGEM-T vector 连接, 连接成功的 pGEM/MAGE-3 克隆送上海生工公司测序。将 pGEX-4T-2 用 Sal I 和 Not I 双酶切, 电泳回收线性载体 pGEX-4T-2。将测序结果正确的 pGEM/MAGE-3 也用 Sal I 和 Not I 双酶切, 电泳回收目的基因 MA-

GE-3, 紫外分光光度计上定量 2 种双酶切产物量。将双酶切后的 pGEX-4T-2 载体与目的基因 MAGE-3 以 1:5 的摩尔比连接, 转化感受态 JM109 大肠杆菌, 在 Amp<sup>r</sup> 琼脂平板上挑选克隆, 抽提重组质粒后, 以 Sal I 和 Not I 双酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果能切出 957bp 的目的基因, 说明 pGEX-MAGE-3 重组载体构建正确 (见图 1)。

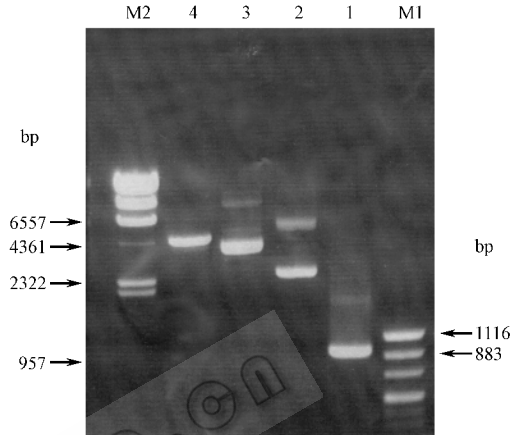


图 1 重组质粒酶切鉴定结果

Fig. 1 Restriction analysis of recombinant pGEX-MAGE-3 plasmid

M1. Puc mix marker 8 (1116, 883, 692, 501, 404, 331, 242, 190, 147, 110, 67, 34, 26, 19) bp; M2.  $\lambda$ DNA/Hind III (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 500) bp; 1. Products of RT-PCR; 2. MAGE-3 pGEM-T-A vector; 3. Recombinant pGEX-MAGE-3 plasmid; 4. The result of double-digestion with Sal I and Not I

### 2.2 GST-MAGE-3 融合蛋白的表达

重组克隆按最优条件诱导表达后, 超声破菌, 将沉淀和上清分别上样进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色。实验组与空载体组及未转化组相比, 在预计大小 (72kD) 附近多出一条带, 沉淀和上清中都有, 但上清中占多数, 约 80% 左右。将上清经 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析, 电泳观察仅留下这条带 (见图 2)。经 Western blot 分析, 在目的蛋白位置有特异条带产生 (见图 3)。说明 pGEX-MAGE-3 重组载体在大肠杆菌中成功地表达了 GST-MAGE-3 融合蛋白。对纯化后的蛋白上清经 Lowry 法测蛋白浓度, 并经 SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白的纯度。结果表明目的蛋白的纯度在 90% 以上, 目的蛋白占细菌总蛋白的 32%, 每 100mL 菌液最终可获得 3mg 左右的目的蛋白。

### 2.3 GST-MAGE-3 融合蛋白体外诱导特异性免疫应答的能力

(1) 组 T 细胞来自与 APC + GST-MAGE-3 蛋白共培养组, 能特异性杀伤 MAGE-3 阳性的 SGC-7901 靶

细胞,而对 MAGE-3 阴性的 MKN-45 靶细胞不能有效地杀伤(2)组 T 细胞来自与 APC + GST 蛋白共培养组,对两组靶细胞都不能有效地杀伤(3)组 T 细胞来自与 APC + PBS 共培养组,由于无抗原刺激,不能诱导有效的特异性 CTLs 杀伤活性,所以对 SGC-7901 和 MKN-45 细胞也不能有效杀伤。经秩和检验统计分析(1)组 T 细胞对两种靶细胞(MAGE-3 阳性和阴性)的杀伤活性有显著性差异( $P < 0.01$ )(2)(3)组 T 细胞对两种靶细胞的杀伤活性无显著性差异( $P > 0.05$ )(1)组与(2)(3)组 T 细胞相比,对 MAGE-3 阳性靶细胞的杀伤活性有显著性差异( $P < 0.01$ ),而对 MAGE-3 阴性靶细胞的杀伤活性无显著性差异( $P > 0.05$ )见图 4。

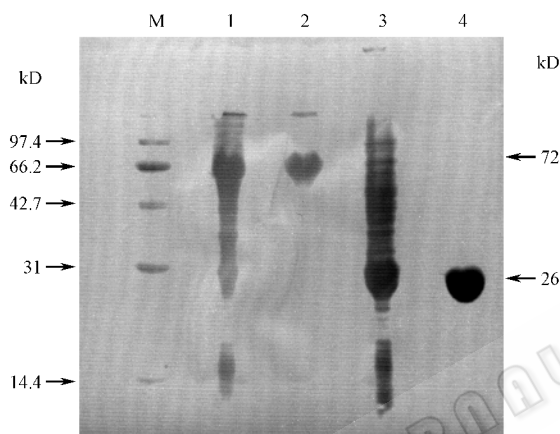


图 2 GST-MAGE-3 在大肠杆菌 BL-21 中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of GST-MAGE-3 expressed in BL-21 M.(97.4, 66.2, 42.7, 31, 14.4 kD); 1. Supernatant of BL-21 transformed with pGEX-4T-2-MAGE-3; 2. Purified GST-MAGE-3 with Glutathione Sepharose 4B; 3. Supernatant of BL-21 transformed with pGEX-4T-2; 4. Purified GST with Glutathione Sepharose 4B

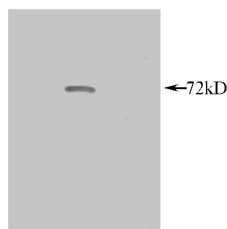


图 3 MAGE-3 的 Western blot 分析

Fig 3 Western blot analysis of GST-MAGE-3 expressed in BL-21

### 3 讨论

在 MAGE-3 分子中已发现了不少受 MHC-I 类分子和 MHC-II 类分子限制的表位,并不断有新的表位发现。肽疫苗在体外确能诱导出特异性抗肿瘤免疫

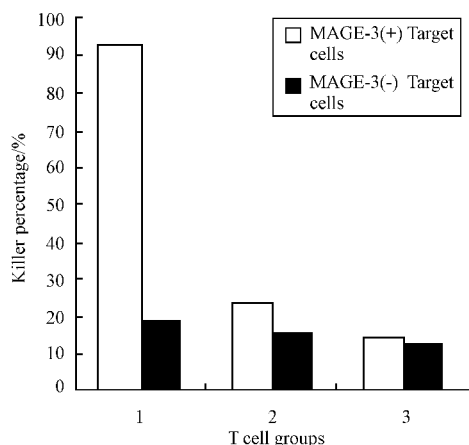


图 4 CTLs 杀伤活性

Fig.4 CTLs kill activity

1. T cells cocultured with DCs + GST-MAGE-3;
2. T cells cocultured with DCs + GST;
3. T cells cocultured with DCs + PBS

应答,但小肽在体内很容易被降解,且受特定的 HLA 表型的限制。根据 MAGE-3 已知抗原表位设计多表位疫苗可以激发针对几种不同抗原表位的 CTLs,但由于对表位的认知还不够充分,所谓的多表位疫苗可能还是遗漏了某些重要的表位。因此我们认为使用 MAGE-3 完整蛋白作为疫苗可能更有意义,因为(1)全蛋白疫苗存在的所有表位都有可能被抗原提呈细胞天然加工处理并提呈给免疫细胞(2)全蛋白疫苗不仅含 CTL 表位,而且还包含 CD4 + T 细胞表位,免疫效果应更好(3)全蛋白疫苗的作用不被特定的 HLA 表型限制,使用更方便而广泛。

谷胱甘肽 S-转移酶(GST)融合载体对于表达、纯化和检测大肠杆菌表达的融合蛋白是有用的工具<sup>[14]</sup>。融合蛋白的表达是可诱导的,并通常水平较高,可用商品化的谷胱甘肽琼脂糖通过亲和层析方便地从细菌裂物中纯化,纯化的条件为非变性条件以维持蛋白的完整性,分子内的 GST 部分还可通过蛋白酶消化被释放,所以获得的蛋白适合于大多数应用,包括抗体的制备、疫苗制备等。大肠杆菌 BL-21 因其缺乏蛋白酶,故能产生更多的全长融合蛋白。

用细菌合成真核蛋白的一个重要限制是当蛋白以高水平表达时会形成包涵体,而降低细菌培养温度或 IPTG 诱导浓度能增加蛋白的可溶性。在本实验中,我们缩短诱导前培养时间,加诱导物后在 25℃ 震荡过夜,不仅融合蛋白的表达量比常规方法有所增加,而且其可溶性也增加。

在本实验中,从大肠杆菌中原核表达的 GST-MAGE-3 融合蛋白负载抗原提呈细胞后,后者能刺

激特异性 T 细胞增殖,诱导 MAGE-3 特异性 CTL 应答,在体外对 MAGE-3 阳性肿瘤细胞表现出明显的杀伤活性。因此以 MAGE-3 蛋白抗原体外负载树突状细胞后回输可能是一种有效的免疫治疗方法。但回输树突状细胞受 MHC 限制性的约束,机体的免疫系统只对自身 DC 提呈的抗原有所应答,因此使用不太方便。如将 MAGE-3 蛋白制成疫苗,则更易以现货供应,使用范围广,且通过基因工程生产疫苗成本低。但 MAGE-3 是一种无突变的正常沉默基因的产物,因此抗原性弱。虽在体外能诱导出特异性抗肿瘤免疫应答,但体内是有区别的,故如何提高 MAGE-3 蛋白疫苗体内免疫的免疫原性,还需深入研究。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Lucas S, De Smet C, Ardem K C *et al.* Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res*, 1998, **58**( 4 ): 743 - 752
- [ 2 ] Tahara K, Mori M, Sadanaga N *et al.* Expression of the MAGE gene family in human hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1999, **85**( 6 ): 1234 - 1240
- [ 3 ] Chen C H, Huang G T, Lee H S *et al.* High frequency of expression of MAGE genes in human hepatocellular. *Liver*, 1999, **19**( 2 ): 110 - 114
- [ 4 ] Melief C J, Toes R E, Medema J P *et al.* Strategies for immunotherapy of cancer. *Adv Immunol*, 2000, **75**: 235 - 282
- [ 5 ] Chauv P, Vantomme V, Stroobant V *et al.* Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4+ T lymphocytes. *J Exp Med*, 1999, **189**( 5 ): 767 - 777
- [ 6 ] Manici S, Stumliolo T, Imro M A *et al.* Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4+ cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J Exp Med*, 1999, **189**( 5 ): 871 - 876
- [ 7 ] Miconnet I, Servis C, Cerottini J C *et al.* Amino acid identity and/or position determines the proteasomal cleavage of the HLA-A 0201-restricted peptide tumor antigen MAGE-3 271 - 279. *J Bio Chem*, 2000, **275**( 35 ): 26892 - 26897
- [ 8 ] Eifuku R, Takenoyama M, Yoshino I *et al.* Analysis of MAGE-3 driven synthetic peptide as a human lung cancer antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Int J Clin Oncol*, 2001, **6**( 1 ): 34 - 39
- [ 9 ] Toungouz M, Lambermont M, Velu T *et al.* Anti-tumor immunotherapy based on dendritic cells. *J Soc Biol*, 2001, **195**( 1 ): 19 - 23
- [ 10 ] Weber J S, Hua F L, Spears L *et al.* A phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected high-risk melanoma. *J Immunother*, 1999, **22**( 5 ): 431 - 340
- [ 11 ] Banchereau J, Palucka A K, Dhodapkar M *et al.* Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res*, 2001, **61**( 17 ): 6451 - 6458
- [ 12 ] Sadanaga N, Nagashima H, Mashino K *et al.* Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res*, 2001, **7**( 8 ): 2277 - 2284
- [ 13 ] Nishiyama T, Tachibana M, Horiguchi Y *et al.* Immunotherapy of bladder cancer using autologous dendritic cells pulsed with human lymphocyte antigen-A24-specific MAGE-3 peptide. *Clin Cancer Res*, 2001, **7**( 1 ): 23 - 31
- [ 14 ] WANG Z H (王卓华), YE K (叶凯), XU H (徐洪) *et al.* Expression and characterization of envelope protein 2 gene of hepatitis G virus in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) 2002, **18**( 2 ): 187 - 192

## Construction of MAGE-3 Prokaryotic Expression Plasmid and Its Expression in *Escherichia coli*

SUN Xiao-Dong<sup>1</sup> WU Jin-Min<sup>2</sup> LIU Xing-E<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Department of General Surgery, <sup>2</sup> Center of Oncology, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

**Abstract** To express the GST-MAGE-3 protein in *E. coli*, and investigate the antitumor immune responses induced by Dendritic cells (DCs) pulsed with GST-MAGE-3 protein, the recombinant expression plasmid pGEX-MAGE-3 was constructed by ligating MAGE-3 gene, which was amplified by RT-PCR and confirmed by sequencing, and the pGEX-4T-2 vector. The recombinant plasmid was transformed into BL-21 *E. coli*. The expression of GST-MAGE-3 was induced with IPTG. The GST-MAGE-3 protein expressed as high as 32% of the total cellular protein. After purification with Glutathione Sepharose 4B, the purity of the protein was more than 90%, and 3mg GST-MAGE-3 was obtained from 100 mL BL-21 lysate. Dendritic cells from gastric carcinoma patients were pulsed with GST-MAGE-3 protein, and these DCs were used to stimulate the autologous T lymphocytes. After 7 days, the T lymphocytes cocultured with DCs pulsed with GST-MAGE-3 antigen exhibited specific cytotoxicity against MAGE-3 positive SGC-7901 cells. It is concluded that the GST-MAGE-3 protein are able to present antigen to T lymphocytes, activate antigen-specific CTLs and induce special antitumor immune responses *in vitro*. Our results lay the groundwork for further research of the MAGE-3 vaccine.

**Key words** GST-MAGE-3 protein, prokaryotic expression, dendritic cells (DCs), cytotoxic T lymphocytes (CTLs), immune response